

ヒト血清タンパク質の網羅的解析技術

治京 玉記

中村学園大学・薬膳科学研究所・分子栄養学部門

キーワード

血清プロテオーム、低発現タンパク質、低分子量タンパク質

緒 言

遺伝子産物であるタンパク質は最終的な生体機能を担っており、疾患に対して直接的な関連付けが可能である。生体の機能から解析されてきたタンパク質は網羅的に解析（プロテオミクス）にシフトしており、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析においていままでの手法では発見できない疾患関連タンパク質・因子を発見できる可能性が高いと考えられている。技術面では、田中耕一¹、J.B.Fenn² らが開発した MALDI 法、ESI 法などのソフトイオン化法により質量分析装置に画期的な技術革新をもたらした。従来では検出不可能であったタンパク質、ペプチドの解析が可能となり、プロテオーム解析が急速に進展している。

血清試料を用いたプロテオーム解析研究は、創薬ターゲット、バイオマーカー探索において中心的な役割が期待されており、最近では難治がんである膵がんの腫瘍バイオマーカー³ がプロテオーム解析技術を用いることで開発に成功している。

本稿では、血清試料の新たな標的として低発現あるいは低分子量タンパク質解析について概説する。

低発現タンパク質解析

血清プロテオーム解析を臨床応用に用いる大きな利点は、疾患によって発現あるいは消失するバイオマーカータンパク質を随時迅速に解析しモニタリングするだけでなく、創薬ターゲットの探索などへ大きな役割を期待されており、臨床研究にプロテオーム解析の実用化はバイオテクノロジーの大きな課題である。

ヒト血清タンパク質解析の特定疾患タンパク質同定は非常に難易度の高い研究である。ヒトタンパク質は、10万種類以上であると推定され、血清中に含まれるタンパク質だけでも約1万種類といわれ、その濃度は約60～80 mg/mL である。その中でアルブミン（66 k Da）、免疫

グロブリン（150～190 k Da）、トランスフェリン（80 k Da）、ハプトグロブリン（85 k Da）、リボタンパク質（数100 k Da）等の高分子量タンパク質はいずれも数 mg/mL 以上の高濃度で存在するため、疾患関連因子として重要と考えられているペプチドホルモン、インターロイキン、サイトカイン等の生理活性タンパク質の血中濃度は数 pg～ng/mL 以下の極微量である。このタンパク質の濃度のダイナミックレンジの広さ^{4,5} がヒト血清タンパク質解析を困難にしている。

このように、疾患関連タンパク質に対してより関心の高い標的タンパク質は、低発現あるいは低分子量タンパク質であり、高発現あるいは高分子量タンパク質の除去を効率的かつ簡便に行うことが血清プロテオーム解析の極めて重要な課題になる。

現在の低発現血清プロテオーム解析は、大別して高濃度タンパク質除去の免疫アフィニティー法と高分子量タンパク質除去に注目した分子量分画法が主にもちいられている。また、タンパク質の酵素消化後のペプチドの分離技術としては、液体クロマトグラフィー（LC）の勾配の改善⁶、イオン交換カラムと逆相カラムを用いる2次元 LC の開発^{7,9}、機器の小型化¹⁰等、質量分析装置では、イオントラップ、フーリエ変換、ハイブリッド等¹¹ の革新的技術開発からプレートの改良¹² 等が行われており、いずれも低発現タンパク質解析に重要な役割を果たしている。

免疫アフィニティー法

免疫アフィニティーによる除去方法として、血中濃度の高い上位の6種類タンパク質（アルブミン、IgG、IgA、トランスフェリン、ハプトグロブリン、アンチトリプシン）^{10, 13-18} または上位12種類（アルブミン、IgG、IgA、トランスフェリン、ハプトグロブリン、フィブリノーゲン、 α 2-マクログロブリン、IgM、 α 1-アンチトリプシン、 α 1-酸性糖タンパク質、アポA1、アポA2）¹⁷

が用いられた結果、それぞれ100～300種類のタンパク質の同定に成功している。血中濃度の高い上位の6から12種類のタンパク質除去法の比較検討として、詳細な血漿タンパク質解析が行われ、HUPO PPP 基準により2401種類のタンパク質が同定された。その結果、ユニークな129種類のタンパク質、さらに共免疫沈澱により40種類のタンパク質の解析に成功している¹⁹。しかし、血中濃度の高い上位の12種類のタンパク質を除去したとしてもまた新たなダイナミックレンジの問題が生じ、さらなるタンパク質除去が求められている。現在、14種類のタンパク質²⁰、20種類のタンパク質²¹、あるいは血中濃度の高い上位の6種類あるいは12種類のタンパク質を除去して、さらに他のアフィニティーカラムを組み合わせる方法によりタンパク質解析研究が行われている。

分子量分画法

全タンパク質の70%以上が60 kDa 以下であり、遺伝子解析からこの領域にバイオマーカーになりうる生理活性タンパク質の存在が示唆されている⁴。分子量分画による分離には、遠心分離による限外ろ過膜を用いる方法と中空糸膜を用いる方法とに大別される。遠心分離による限外ろ過膜法によりアルブミン、免疫グロブリン、トランスフェリン、リポタンパク質を除去してプロテオミクス解析すると、340種類のタンパク質⁵、260種類のタンパク質²² が同定され、分子量10 kDa 以下のタンパク質解析¹¹ では、50種類のタンパク質が同定され、細胞外マトリックスタンパク質、エフリン受容体、ビタミンD 結合タンパク質等の癌関連タンパク質からプレクチン、プロトロンビン等のユニークなタンパク質検出に成功している。また、乳癌での網羅的解析において分子量30 kDa 以下のタンパク質の網羅的解析でペプチドの断片で優位な差が得られている²³。

中空糸膜法では、分子量30 kDa 以下のタンパク質の網羅的解析では、中空糸膜を含む3D-LC-MS/MS システムにより、約1800種類のタンパク質（95%以上の信頼性）が同定された²⁴。別途、スパイクタンパク質を用いた基礎検討も行われており²⁵、今後の技術開発が期待されている。

膜分離を用いない方法として有機溶媒抽出がある。アルブミンと低分子量タンパク質との相互作用を解離させることで微量タンパク質の同定²⁶、あるいは、IGF-II、チモシンβ4、β9、プラスミノゲン、凝固要因と細胞外マトリックスタンパク質等のユニークなタンパク質の同定²⁷ が報告されている。

低発現タンパク質解析の今後

免疫アフィニティー法と分子量分画法について概説したが、最近では、両方法を併用した分離法が主流になりつつある²⁸。

また、特定の高発現・高分子量タンパク質を除去するのではなく、不特定タンパク質を除去する方法として、疎水性、親水性、等電点、基質特異性などの蛋白質の性状を用いるプロテインチップアレイ法、タンパク質を均等化するビーズ法が実用化されてきている。プロテインチップアレイ法としては、SELDI-TOF MS²⁹⁻³¹ による多次元分離プロファイリングにより肝疾患の網羅的解析で優位な相違が得られ²⁸、磁気ビーズ法³² では乳癌³³ や盲目³⁴ の網羅的解析、リガンド結合ビーズ³⁵⁻⁴¹ では肺がんの網羅的解析¹² から疾患関連タンパク質の報告がなされ、新技術の開発と網羅的解析が同時に進行している。

現在、血清の網羅的プロテオーム解析が進展するに伴い、プロテオーム解析に求められている疾患関連タンパク質の発見には、微量タンパク質の解析に焦点を絞った解析方法の需要が大きくなっていく。さらに、質量分析装置等の機器測定の進化とともに前処理段階での「より簡便に、より迅速に、より低コストに」の要望と期待が寄せられている。従来の分離・精製・解析方法では不十分であることから、臨床研究における創薬ターゲット、バイオマーカー探索には、タンパク質レベルでの分離・精製技術のハイスループット化、ハイクオリティー化、低コスト化の技術開発はもちろんのこと、ペプチド・低分子化合物などの化学的リガンドを用いた新領域の統合により更なる期待を寄せることができる。

参考文献

1. Tanaka, K., Ido Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida T. Development of Laser Ionization Time of Flight Mass Spectrometer IV—Generation of Quasi-Molecular Ions from High Mass Organic Compound. 35-kai Shitsuryo Bunseki Rengo Toronkai, Yoshishu 23, 22-23 (1987).
2. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science 246, 64-71 (1989).
3. Honda, K. et al. Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. Cancer Res 65, 10613-22 (2005).
4. Anderson, N. L. & Anderson, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Mol Cell Proteomics 1, 845-67 (2002).
5. Tirumalai, R. S. et al. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. Mol Cell Proteomics 2, 1096-103 (2003).
6. Morris, D. L., Jr., Sutton, J. N., Harper, R. G. &

- Timperman, A. T. Reversed-phase HPLC separation of human serum employing a novel saw-tooth gradient: toward multidimensional proteome analysis. *J Proteome Res* 3, 1149-54 (2004).
7. Zuo, X. & Speicher, D. W. Comprehensive analysis of complex proteomes using microscale solution isoelectrofocusing prior to narrow pH range two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2, 58-68 (2002).
8. Faca, V. et al. Contribution of protein fractionation to depth of analysis of the serum and plasma proteomes. *J Proteome Res* 6, 3558-65 (2007).
9. Kulasingam, V. & Diamandis, E. P. Proteomics analysis of conditioned media from three breast cancer cell lines: a mine for biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Proteomics* 6, 1997-2011 (2007).
10. Zhou, M. et al. An investigation into the human serum "interactome". *Electrophoresis* 25, 1289-98 (2004).
11. Zheng, X., Baker, H. & Hancock, W. S. Analysis of the low molecular weight serum peptidome using ultrafiltration and a hybrid ion trap-Fourier transform mass spectrometer. *J Chromatogr A* 1120, 173-84 (2006).
12. Wang, J., Chen, R., Ma, M. & Li, L. MALDI MS sample preparation by using paraffin wax film: systematic study and application for peptide analysis. *Anal Chem* 80, 491-500 (2008).
13. Wang, Y. Y., Cheng, P. & Chan, D. W. A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis. *Proteomics* 3, 243-8 (2003).
14. Ahmed, N. et al. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. *Proteomics* 3, 1980-7 (2003).
15. Kuhn, E. et al. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards. *Proteomics* 4, 1175-86 (2004).
16. Echan, L. A., Tang, H. Y., Ali-Khan, N., Lee, K. & Speicher, D. W. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 5, 3292-303 (2005).
17. Huang, L. et al. Immunoaffinity separation of plasma proteins by IgY microbeads: meeting the needs of proteomic sample preparation and analysis. *Proteomics* 5, 3314-28 (2005).
18. Martosella, J., Zolotarjova, N., Liu, H., Nicol, G. & Boyes, B. E. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic prefractionation of immunodepleted human serum proteins to enhance mass spectrometry identification of lower-abundant proteins. *J Proteome Res* 4, 1522-37 (2005).
19. Gong, Y. et al. Different immunoaffinity fractionation strategies to characterize the human plasma proteome. *J Proteome Res* 5, 1379-87 (2006).
20. Zolotarjova, N., Mrozinski, P., Chen, H. & Martosella, J. Combination of affinity depletion of abundant proteins and reversed-phase fractionation in proteomic analysis of human plasma/serum. *J Chromatogr A* (2007).
21. M. Schuchard, C. M., A. Crawford, H. Chapman, S. Cockrill, K. Ray, R. Mehig, D. Chen, and G. Scott. Specific Depletion of Twenty High Abundance Proteins from Human Plasma. NCI Proteomic Technologies Reagents Resource Workshop (2005).
22. Harper, R. G., Workman, S. R., Schuetzner, S., Timperman, A. T. & Sutton, J. N. Low-molecular-weight human serum proteome using ultrafiltration, isoelectric focusing, and mass spectrometry. *Electrophoresis* 25, 1299-306 (2004).
23. Aresta, A. et al. Impact of sample preparation in peptide/protein profiling in human serum by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 46, 157-64 (2008).
24. Tanaka, Y. et al. A novel approach and protocol for discovering extremely low-abundance proteins in serum. *Proteomics* 6, 4845-55 (2006).
25. Zattoni, A. et al. Hollow-fiber flow field-flow fractionation of whole blood serum. *J Chromatogr A* 1183, 135-42 (2008).
26. Merrell, K. et al. Analysis of low-abundance, low-molecular-weight serum proteins using mass spectrometry. *J Biomol Tech* 15, 238-48 (2004).
27. Tucholska, M. et al. Endogenous peptides from biophysical and biochemical fractionation of serum analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization hybrid quadrupole time-of-flight. *Anal Biochem* 370, 228-45 (2007).
28. Cui, J. F. et al. Screening serum hepatocellular carcinoma-associated proteins by SELDI-based protein spectrum analysis. *World J Gastroenterol* 14, 1257-62 (2008).
29. Kozak, K. R. et al. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12343-8 (2003).
30. Gast, M. C., Engwegen, J. Y., Schellens, J. H. & Beijnen, J. H. Comparing the old and new generation SELDI-TOF MS: implications for serum protein profiling. *BMC Med Genomics* 1, 4 (2008).
31. Caputo, E. et al. Peptide profiling in epithelial tumor plasma by the emerging proteomic techniques. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 819, 59-66 (2005).
32. Yao, N., Chen, H., Lin, H., Deng, C. & Zhang, X. Enrichment of peptides in serum by C(8)-functionalized magnetic nanoparticles for direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A* 1185, 93-101 (2008).
33. Peter, J. F., Otto, A. M. & Wolf, B. Enrichment and detection of molecules secreted by tumor cells using magnetic reversed-phase particles and LC-MALDI-TOF-MS. *J Biomol Tech* 18, 287-97 (2007).

34. Zamora, D. O. et al. Proteomic profiling of human retinal and choroidal endothelial cells reveals molecular heterogeneity related to tissue of origin. *Mol Vis* 13, 2058-65 (2007).
35. Righetti, P. G., Castagna, A., Antonioli, P. & Boschetti, E. Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis* 26, 297-319 (2005).
36. Righetti, P. G. et al. Proteome analysis in the clinical chemistry laboratory: myth or reality? *Clin Chim Acta* 357, 123-39 (2005).
37. Guerrier, L. et al. Reducing protein concentration range of biological samples using solid-phase ligand libraries. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 833, 33-40 (2006).
38. Righetti, P. G., Boschetti, E., Lomas, L. & Citterio, A. Protein Equalizer Technology: the quest for a "democratic proteome". *Proteomics* 6, 3980-92 (2006).
39. Righetti, P. G. & Boschetti, E. Sherlock Holmes and the proteome--a detective story. *Febs J* 274, 897-905 (2007).
40. Thulasiraman, V. et al. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. *Electrophoresis* 26, 3561-71 (2005).
41. Guerrier, L., Lomas, L. & Boschetti, E. A simplified monobuffer multidimensional chromatography for high-throughput proteome fractionation. *J Chromatogr A* 1073, 25-33 (2005).
42. Au, J. S. et al. Deep proteome profiling of sera from never-smoked lung cancer patients. *Biomed Pharmacother* 61, 570-7 (2007).